

Deep-UV excitation fluorescence microscopy for detection of lymph node metastasis using deep neural network

論文内容の要旨

胃癌や乳癌などの手術において、領域リンパ節への転移を術中診断することによって不必要な摘出を防ぎ、術後機能障害による生活の質の低下を回避するセンチネルリンパ節術中迅速診断が行われている。そのためには、リンパ節転移の正確な術中診断が必要不可欠である。

通常、リンパ節転移の術中迅速診断には凍結薄切、HE 染色切片が用いられているが、切片作製における組織の薄切は熟練の技術を要し、また標本の作製から病理医診断まで 30 分以上の時間を要する。また凍結切片は氷晶形成などの影響で、概して標本の質も悪く、経験豊富な病理医の診断を要する。これらの問題に対応するために、我々は以下に述べる 2 つのアプローチに注目した。

1 つ目が、組織形態を迅速に可視化できるイメージング法である。波長 300nm 以下の深紫外光が組織表面への透過性が低い性質を持つこと、蛍光染色が短時間で行えること、を利用して、組織を薄切せずにより短時間で組織をイメージングする方法の開発に取り組んだ。癌組織の診断を行う上で、核や細胞の形・大きさや核小体の形などの細胞異型、細胞配置などの構造異型といった形態情報が重要である。深紫外励起イメージングを行うにあたって、適切な蛍光プローブの探索を試み、我々は既に、希土類イオンの一つであるテルビウムイオンを用いて組織構造・細胞構造をコントラストよくイメージングできる染色法を開発している (Kumamoto, et al. Sci. Rep. 2019)。

2 つ目が、ディープニューラルネットワーク (DNN) を用いた人工知能 (AI) 画像解析である。DNN は機械学習の一種であり、近年画像分類の分野で目覚ましい発展を遂げている。DNN の導入により、病理医間の診断のばらつきを解消することが可能であり、また病理医にとって馴染みのない蛍光画像の学習も短時間で行うことができる。

DNN 解析における深紫外励起画像の分類精度を評価するために、大量に画像を取得することが可能であるホルマリン固定、パラフィン包埋 (FFPE) ブロックを薄切したサンプルを使用して、以下の実験を行った。

まず、ヒトの胃癌患者のリンパ節の FFPE ブロックの連続切片を作製し、それぞれ HE 染色、蛍光染色を行い、病理所見の比較を行った。胃癌の転移巣の腺管構造、篩状構造、充実性構造などを容易に認識することができ、また癌細胞内の核、核小体、細胞質といった細胞内構造もコントラスト良くイメージングすることができた。

次に、胃癌リンパ節転移検出のための AI アルゴリズムの構築に取り組んだ。具体的には、まずヒトの胃癌リンパ節薄切切片をサンプルとして、転移・非転移の蛍光画像を収集し小パッチ (278×278 ピクセル) に分割し、学習セット、検証セット、テストセットに割り当てた。学習セット、検証セットを用いて、複数の AI のオープンソースアルゴリズムに学習させ、得られたモデルを用いて、テストセットの転移有り・無しのパッチ画像をどれほどの精度で分類できるかという解析を行った。その結果、最も成績の良かったモデルで、経験のある病理

医が分類した結果に対して 98.8% の一致率を得ることができた。さらに、同一リンパ節組織から得られた HE 画像に対する AI 解析においては 99.4% であった。

t-distributed stochastic neighbor embedding (t-SNE) と呼ばれる手法を用いた二次元圧縮でも、転移陽性パッチ画像と転移陰性パッチ画像が明瞭な 2 つのクラスターを形成することを視覚的に確認することができた。また分類精度だけでなく、DNN が画像内のどの部分により注目しているかをヒートマップで可視化する gradient-weighted class activation mapping (Grad-CAM) を用いた解析を行い、総じて転移巣に注目して転移有りと判断していることが明らかとなった。

リンパ節の転移の有無を診断する際には、サンプルの一部だけではなくリンパ節全体をスクリーニングする必要があるため、前述の小パッチの転移分類モデルを発展させ、より広視野の画像に対して、転移巣をマッピングするという解析も行った。具体的には、278×278 ピクセルのウィンドウを 10 ピクセルずつ移動させながら転移の有無の診断を行い、転移有りと診断した場合にマーキングを行うという手法である。この方法でマッピングを行うと、一定の割合で偽陽性のマーキングピクセルが出現するため、閾値処理を行い、偽陽性ピクセルを消去するという処理を行った。即ち、ある一定の領域内で、転移陽性ピクセルの割合が閾値以下であれば、その領域は転移陰性とみなす、という処理である。この処理を加えることで、より正確な転移巣のマッピングが可能となった。

これらの結果より、DNN 解析において、我々が開発した染色法・観察法で得られた蛍光画像を用いて、高い精度でパッチの画像分類を行うことができ、また HE 画像と同等の病理医に近い判定力を有することが示された。